



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana-Marija Lulić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SPREGNUTI SUSTAV LC-NMR U ANALIZI ONEČIŠĆENJA LIJEKOVA

Završni rad

Rad je izrađen na Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Prof.dr.sc. Predrag Novak

Neposredni voditelj rada: Doc.dr.sc. Tomislav Jednačak

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

27. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2017.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Predrag Novak

Potpis:

§ SAŽETAK.....	7
§ 1. UVOD.....	9
§ 2. SPREGNUTI SUSTAV LC-NMR.....	11
2.1. Tekućinska kromatografija.....	11
2.2. Eksperimentalna izvedba	11
2.3. Spregnuti sustav LC-SPE-NMR	13
2.4. Sprezanje sa sprektrometrijom masa	14
2.5. Krio-tehnologija	15
§ 3. IDENTIFIKACIJA PRODUKATA REAKCIJE KARBOHIDRAZIDA I SALICILALDEHIDA POMOĆU SPREGNUTOG SUSTAVA LC-DAD-SPE-NMR....	16
3.1. Sinteza.....	16
3.2. Eksperimentalna izvedba sustava LC-DAD-SPE-NMR.....	17
3.3. Rezultati.....	17
§ 4. IDENTIFIKACIJA METABOLITA PARACETAMOLA IZ LJUDSKOG URINA	20
4.1. Eksperimentalna izvedba sustava LC-SPE-NMR-MS	20
4.2. Rezultati	20
4.3. Mehanizam nastajanja glukurodnidnog etera 3-metoksi-paracetamola	23
§ 5. IDENTIFIKACIJA ONEČIŠĆENJA AKARBOZE POMOĆU SPREGNUTIH SUSTAVA LC-NMR I LC-MS	24
5.1. Priprema uzoraka	24
5.2. Eksperimentalna izvedba	24
5.3. Rezultati i identifikacija onečišćenja	25
§ 6. IDENTIFIKACIJA METABOLITA 2-TOLFENAMIČNE KISELINE SPREGNUTIM SUSTAVIMA SPE-NMR I LC-NMR.....	27
6.1. Priprema uzoraka	28
6.2. Eksperimentalna izvedba	28
6.3. Rezultati i identifikacija metabolita.....	28
§ 7. ZAKLJUČAK	30
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	31

§ SAŽETAK

U današnje vrijeme velika pozornost se posvećuje identifikaciji onečišćenja lijekova i to već u ranim fazama istraživanja i razvoja. Poznavanje strukture onečišćenja je od velike važnosti jer može pojasniti njihovo podrijetlo, svojstva, kataboličke puteve i razgradne mehanizme što može olakšati kontrolu procesa sinteze lijeka, objasniti nuspojave nekog lijeka te dati uvid u genotoksičnost. Onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje lijekova, a dijele se na organska i anorganska te otapalo koje zaostaje u reakcijskoj smjesi nakon što je reakcija sinteze lijeka završena. Organska i anorganska onečišćenja mogu biti razni reagensi, nusprodukti, međuprodukti, katalizatori, ligandi, anorganske soli i metali.¹

§ 1. UVOD

Identifikacija i strukturna karakterizacija onečišćenja lijekova te utvrđivanje njihovih svojstava iznimno je važan korak u procesu proizvodnje farmaceutskog proizvoda. Onečišćenja prisutna u lijekovima predstavljaju i sigurnosni rizik s obzirom da takve tvari mogu uzrokovati mutacije, biti kancerogena ili uzrokovati razne nuspojave u ljudskom organizmu. Kako bi se mogao ispitati utjecaj onečišćenja na stanice i metaboličke puteve, analizirani sastojak prvo je potrebno izolirati i identificirati.¹

Moguće je analizirati razne vrste uzoraka: biljne ekstrakte, metabolite iz urina, krvne plazme, žuči, itd. U analizi metabolita iz urina, krvne plazme i žuči potrebna je priprema uzoraka koja je kod analize metabolita iz urina relativno jednostavna i zahtjeva centrifugiranje i filtraciju. Zatim je potrebno ukoncentrirati uzorak pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi i eluirati ga u kromatografsku kolonu. Međutim, priprema uzoraka iz žuči je nešto zahtjevnija zbog visoke koncentracije žučnih soli i staničnih komponenti.^{2,3}

Klasičan pristup identifikaciji onečišćenja uključuje odjeljivanje od glavne djelatne tvari i ukoncentriravanje onečišćenja, što se može postići brojnim kromatografskim metodama. Odijeljeno onečišćenje se zatim detektira najčešće pomoću detektora temeljenog na apsorpciji ultraljubičastom i vidljivom području spektra (UV-Vis), fluorescenciji ili nekom drugom svojstvu. Upotrebljavaju se i detektori koji mjere indeks loma, raspršenje svjetlosti, optičku aktivnost, fotoionizaciju, električnu provodnost ili razliku potencijala između 2 elektrode. Za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju analita u otopini često se koriste spektroskopske metode. Strukturna analiza spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) uključuje asignaciju signala na temelju kemijskih pomaka, integrala, multipletnosti i konstanti sprežanja u jedno- i višedimenzijskim spektrima.² Međutim, strukturu nekog analita nije uvijek moguće odrediti samo upotrebom spektroskopije NMR pa se za dobivanje cjelovitih podataka o strukturi često koriste i druge metode, poput spektrometrije masa i vibracijske spektroskopije.^{3,4}

§ 2. SPREGNUTI SUSTAV LC-NMR

2.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je jedna od kromatografskih metoda za odjeljivanje smjese analita. Odvajanje se temelji na različitoj raspodjeli komponenata između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze u kromatografskoj koloni. Vrijeme zadržavanja određene komponente može dati informaciju o relativnoj polarnosti i topljivosti pojedine komponente smjese.¹

Kako bi se povećala učinkovitost i brzina kromatografskog odjeljivanja, sve češće se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili HPLC (*engl. high performance liquid chromatography*), koja se izvodi pri visokom tlaku, do 400 bar, koji se postiže upotrebom tlačnih pumpi. Koriste se kratke kolone duljina 3-7 cm i promjera 1-4,6 mm koje se pune poroznim česticama veličine 3-10 µm, a veličina čestica može varirati ovisno o potrebi. Kao porozni materijal najčešće se koriste silika-gel, aluminijev oksid i sintetička smola polistiren-divinil benzen. Često se primjenjuje gradijentno eluiranje u kojem se kao mobilna faza koriste 2 ili više otapala različitih polarnosti koji se propuštaju u kromatografsku kolonu pomoću ventila. Omjer otapala koji će se koristiti u određenom trenutku kromatografskog odjeljivanja može se automatizirati. Upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti skraćuje se vrijeme kromatografskog odjeljivanja pa je tako i količina otapala potrebnog za eluiranje manja, a analiza isplativija i ekološki prihvatljivija.⁴

2.1.1. UV-Vis detektori

Izlazak pojedine komponente iz kromatografske kolone nakon odjeljivanja detektira se najčešće pomoću UV-Vis detektora. Kao rezultat dobiva se kromatogram koji prikazuje ovisnost odziva detektora, npr. apsorbancije, o vremenu. Iz dobivenih spektara moguće je dobiti strukturne informacije o pojedinom analitu, a njihovom usporedbom sa spektrima iz baza podataka može se pretpostaviti o kojem analitu je riječ. Upotrebljavaju se detektori koji mjere apsorbaciju pri određenoj valnoj duljini ili DAD-detektori (*engl. diode array detectors*) koji mogu snimiti spektar u širem području valnih duljina.³⁻⁵

2.2. Eksperimentalna izvedba

Postoji nekoliko načina izvedbe spregnutog sustava LC-NMR:

- tehnika kontinuiranog protoka
- tehnika zaustavljenog protoka,
- tehnika skladištenja pikova u kapilarnim petljama,
- tehnika skladištenja pikova na krutom nosaču.

2.2.1. Tehnika kontinuiranog protoka

U tehnici kontinuiranog protoka kromatografska kolona je direktno spregnuta sa spektrometrom NMR i ne dolazi do zaustavljanja protoka analita, tj. spektri se snimaju paralelno s kromatografskim odjeljivanjem. Analit se u protočnoj ćeliji NMR-a zadržava vrlo kratko, što rezultira niskim omjerom signala i šuma. Omjer signala i šuma moguće je povećati usporavanjem eluiranja, što s druge strane može smanjiti učinkovitost odjeljivanja komponenti smjese na kromatografskoj koloni. Stoga je brzinu protoka je potrebno prilagoditi osjetljivosti sustava i optimalnim uvjetima kromatografskog odjeljivanja. Nadalje, kromatografsku kolonu i spektrometar NMR potrebno je postaviti što bliže kako bi se smanjilo širenje pikova tijekom njihovog prijenosa s kromatografske kolone u sondu NMR. Ova tehnika zahtjeva veliku koncentraciju analita i pogodna je za snimanje jednodimenzijskih ^1H i ^{19}F NMR-spektara.

2.2.2. Tehnika zaustavljenog protoka

Ako se koristi tehnika zaustavljenog protoka, kromatografsko odjeljivanje se automatski zaustavlja kada analit napuni protočnu ćeliju spektrometra NMR, što omogućuje statične uvjete za akviziciju spektara. Nakon snimanja spektara, kromatografsko odjeljivanje se nastavlja uz prethodnu brzinu protoka. U slučaju izvedbe tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti protok se zaustavlja na HPLC pumpi, a tijekom snimanja spektara NMR potrebno je održavati konstantan tlak na kromatografskoj koloni. Postoje 2 izvedbe tehnike zaustavljenog protoka: tehnika u kojoj se protok zaustavlja pomoću ventila i tehnika u kojoj se pikovi skladište u kapilarnim petljama.

Ako se protok zaustavlja pomoću ventila, potrebno je odrediti vrijeme odgode, odnosno, vrijeme potrebno za prijenos analita iz kromatografske kolone do sonde NMR. Vrijeme odgode ovisi o brzini protoka, promjeru i duljini kapilare kojom se analit prenosi iz kromatografske kolone u sondu NMR. Nakon kalibracije vremena odgode pomoću računala može se podesiti automatsko zaustavljanje protoka. Ovakav postupak se, zatim, ponavlja za ostale komponente smjese. Međutim, prevelik broj zaustavljanja protoka može poremetiti odjeljivanje smjese, a komponente prisutne u velikoj koncentraciji mogu onečistiti sondu NMR.

Određene frakcije analita moguće je skladištiti i u kapilarnim petljama. Ovakav postupak se može automatizirati pomoću računala pa je snimanje spektara neovisno o kromatografskom odjeljivanju. Važan preduvjet za primjenu ove tehnike je stabilnost analiziranih komponenti.

Navedene metode pogodne su za odjeljivanje složenih smjesa u kojima su pojedine komponente prisutne u maloj koncentraciji, a omogućuju snimanje dvodimenzijskih spektara NMR.^{1-2,6-9}

2.2.3. Nedostaci spregnutog sustava LC-NMR

Spregnuti sustav LC-NMR počeo se upotrebljavati u analizi još prije 30 godina. Međutim, znanstvenici su se susreli s brojnim problemima kao što su neosjetljivost detektora NMR. Tako je količina uzorka potrebna za analizu obično veća od 100 μg , dok je za kromatografsko odjeljivanje potrebno manje od 100 μg . Nadalje, veliki problem je širenje pikova prilikom njihova prijenosa iz kromatografske kolone u protočnu ćeliju NMR i razrjeđenje uzorka prilikom ulaska u NMR cijevčicu. Navedene pojave mogu se spriječiti sprežanjem s ekstrakcijom na čvrstoj fazi o čemu će više riječi biti u idućem poglavlju. U analizi određene

smjese spregnutim sustavom LC-NMR se mogu koristiti otapala bilo koje polarnosti ovisno o topljivosti i polarnosti analita.

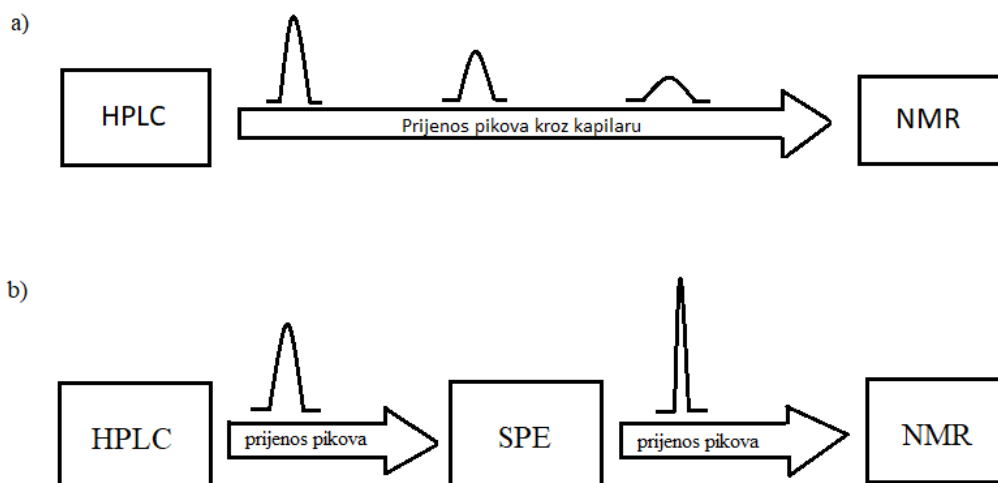
Zatim, veliki problem u analizi LC-NMR je upotreba skupih deuteriranih otapala. Kada se analit s kolone otopi u deuteriranom otapalu, moguće je da sadrži vodu ili zaostali eluens koji će prekriti signale analita pa se zbog toga koriste tehnike supresije signala kao što su WET, WATERGATE ili prezasićenje (NOESY-tip).^{2,5-8,10}

2.3. Spregnuti sustav LC-SPE-NMR

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE) je jedna od najkorištenijih metoda analize spregnutim sustavom LC-NMR. Čvrstu fazu čine kratke kromatografske kolone napunjene stacionarnom fazom koje se postavljaju između kromatografske kolone i protočne ćelije NMR. Nakon kromatografskog odjeljivanja, analit otopljen u organskom otapalu se razrjeđuje s malo vode i zatim ekstrahira na čvrstu fazu, a moguće je i višestruko ekstrahiranje istog analita na istu fazu kako bi se ukoncentrirao uzorak, tj. kako bi se izolirala što veća količina analita. Nakon ekstrahiranja analita na čvrstu fazu, višak otapala može se ukloniti sušenjem tekućim dušikom ili uparavanjem, a analit se otapa u deuteriranom otapalu i prenosi u protočnu ćeliju NMR.

Kao čvrsta stacionarna faza mogu se koristiti čestice silikagela derivatizirane nepolarnim alifatskim C-2, C-8, C-18 skupinama, čestice aluminijevog oksida pri različitim vrijednostima pH, magnezijev silikat, smola ili porozni materijal kao što je ugljen. Između analita i stacionarne faze moraju se ostvariti što jače hidrofobne interakcije kako bi se izolirala što veća količina analita pogodna za snimanje spektara NMR. Nedostatak upotrebe poroznog materijala kao čvrste faze je mogućnost katalize reakcije u kojima nastaju slobodni radikali, što može destabilizirati pojedine analite.

Spregnuti sustav LC-SPE-NMR pokazuje mnogo prednosti, npr. ukoncentriravanjem uzorka poveća se omjera signala i šuma, što smanjuje vrijeme snimanja spektara NMR, a dolazi i do sužavanja pikova prilikom njihova prijenosa iz kromatografske kolone u protočnu ćeliju NMR (**slika 1**). Pri kromatografskom odjeljivanju uz ekstrakciju na čvrstoj fazi moguća je primjena nedeuteriranih otapala koja su puno jeftinija od deuteriranih. Budući da je ekstrakciju na čvrstoj fazi moguće izvesti u bilo kojem otapalu pogodnom za kromatografsku analizu, za odjeljivanje smjese analita mogu se primjeniti različite kromatografske tehnike kao što su tehnika obrnutih faza, ionsko-izmijenjivačka kromatografija i gel-filtracija.^{2,5-8,10-13}



SLIKA 1. Shematski prikaz prijenosa pikova u spregnutim sustavima: a) LC-NMR, b) LC-SPE-NMR.

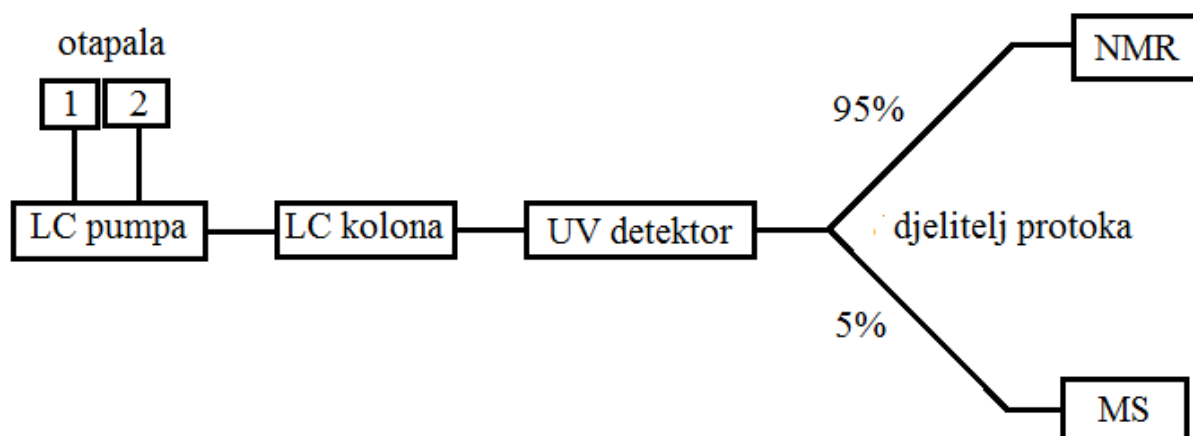
2.4. Sprezanje sa spektrometrijom masa

Spregnuti sustav LC-NMR često nije dovoljan za identifikaciju svih komponenti prisutnih u smjesi i zato se taj sustav može spregnuti sa spektrometrijom masa. Na taj način mogu se dobiti vrijednosti molarnih masa pojedinih komponenti i njihovih fragmenata, što može znatno olakšati analizu. Nadalje, neke funkcijske skupine ne pokazuju signale u spektrima NMR, a ponekad se mogu identificirati na temelju fragmenata u spektrima MS.

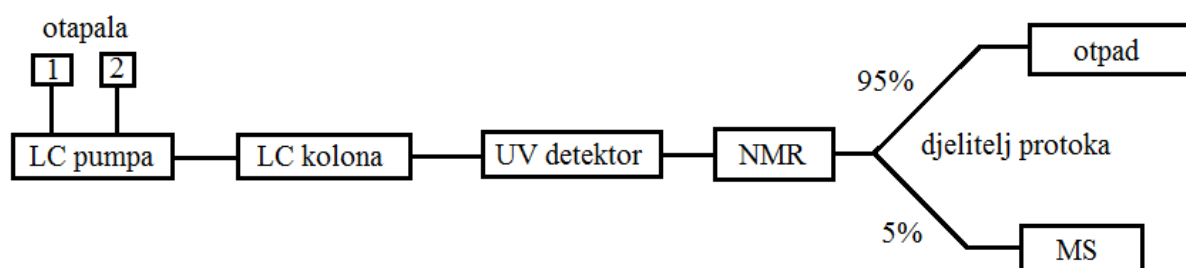
Tekućinska kromatografija se sa spektrometrima NMR i MS može spregnuti na 2 načina: serijski i paralelno. Najčešće se koristi paralelni način povezivanja kod kojeg se protok (F) dijeli u omjeru $F(\text{NMR}):F(\text{MS})=20:1$. Takav omjer koristi se zbog puno veće osjetljivosti spektrometra MS kao detektora. Pritom se spektri NMR i MS snimaju istodobno. Na **slici 2** shematski je prikazan paralelan način povezivanja tekućinskog kromatografa (LC) sa spektrometrima NMR i MS.

Kod serijskog načina povezivanja protok odlazi u protočnu ćeliju NMR na analizu. Zatim dolazi do djelitelja koji 5% analita usmjerava u spektrometar MS, a ostatak u otpad. Budući da upotrebom deuteriranih otapala dolazi do izmjene protona s deuterijem iz molekula otapala zbog čega se može dobiti pogrešna molarna masa, analit je nakon NMR analize moguće reptonirati. Na **slici 3** shematski je prikazan serijski način povezivanja tekućinskog kromatografa (LC) sa spektrometrima NMR i MS.

Smještanje kromatografske kolone i spektrometra MS u blizinu magneta NMR s vrlo jakim magnetnim poljem je dugi niz godina bio veliki problem. Ova poteškoća uspješno je riješena primjenom modernih, zaštićenih (engl. *shielded*) magneta, gdje se uređaji LC, MS i NMR mogu postaviti na udaljenosti i do 1 m.^{2,3,6,10}



SLIKA 2. Prikaz paralelnog povezivanja suatava LC-NMR-MS.



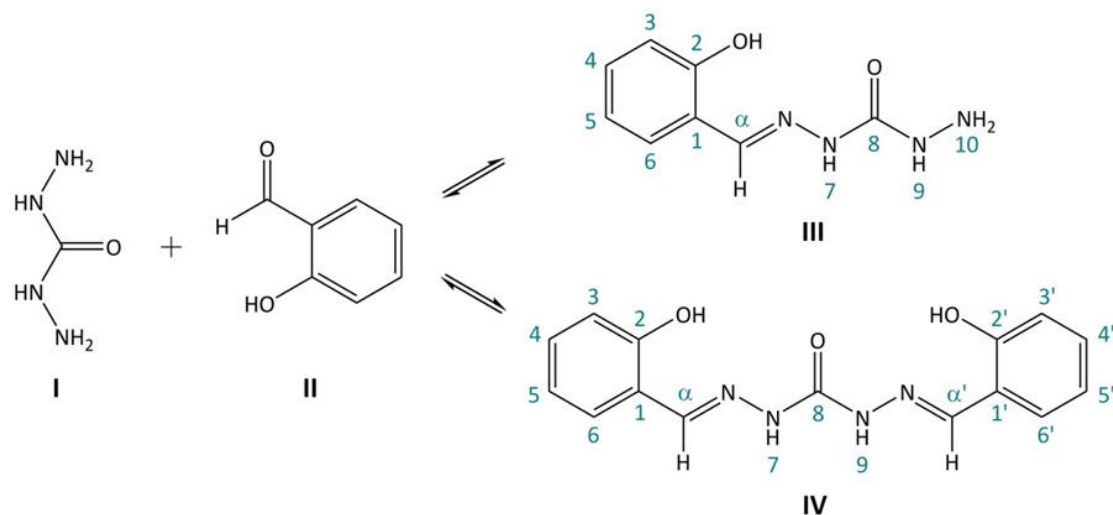
SLIKA 3. Prikaz serijskog povezivanja sustava LC-NMR-MS.

2.5. Krio-tehnologija

Zadnjih nekoliko godina sve češće je u upotrebi tehnologija hlađenja sonde, odnosno, radiofrekvencijskih zavojnica, pomoću tekućeg dušika ili helija do temperature od 20 K pri čemu dolazi do značajnog smanjenja toplinskog šuma i povećanja omjera signala i šuma 3–4 puta. Osim toga, smanjuje se vrijeme snimanja spektara NMR što je posebno značajno kod detekcije slabije zastupljenih jezgara, poput ^{13}C i ^{15}N . Nadalje, potrebna je znatno manja količina uzorka, što je pogodno za analizu smjesa dobivenih iz prirodnih izvora.^{2,8}

§ 3. IDENTIFIKACIJA PRODUKATA REAKCIJE KARBOHIDRAZIDA I SALICILALDEHIDA POMOĆU SPREGNUTOG SUSTAVA LC-DAD-SPE-NMR

Karbohidrazid je organski spoj koji pripada u skupinu karbazida i dobiva se reakcijom ugljične kiseline i hidrazina. Reakcijom karbohidrazida i određenog aldehida ili ketona dobiva se smjesa aromatskih imina, derivata karbohidazida. Reakcija sinteze derivata karbazida i strukture reaktanata i produkata prikazani su na **slici 4**.



SLIKA 4. Reakcija kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida, **I**-karbohidrazid, **II**-salicilaldehid, **III**-(saliciliden)karbohidrazid, **IV**-bis(saliciliden)karbohidrazid.¹⁴

Uočeno je da su derivati karbohidrazida biološki spojevi s antivirusnim, antifungalnim, antimalaričnim i citoskičnim djelovanjem pa imaju i potencijalnu farmaceutsku primjenu. Nadalje, mogu djelovati kao ligandi i stabilizirati metalne ione u različitim oksidacijskim stanjima.¹⁴

3.1. Sinteza

0,6 g karbohidrazida otopljeno je u 40 mL metanola. Zatim je dodano 0,71 mL salicilaldehida i nekoliko kapi piperidina. Reakcijska smjesa zagrijana je do 55 °C i miješana 40 min uz refluksiranje pri čemu je došlo do taloženja bijelog kristaliničnog produkta. Produkt je ofiltriran, ispran s malom količinom metanola i posušen na zraku.

3.2. Eksperimentalna izvedba sustava LC-DAD-SPE-NMR

U kromatografskoj analizi korišten je sustav HPLC u koji je bilo uneseno 25 μL uzorka uz brzinu protoka od 1,0 mL/min, a kao mobilna faza korištena je smjesa acetonitrila i fosfatnog pufera (pH=7) pri temperaturi od 298 K. Vrijeme kromatografskog odjeljivanja iznosilo je 10 min. Nakon kromatografske kolone postavljen je DAD-detektor pomoću kojeg su detektirani pikovi pojedinih komponenti.

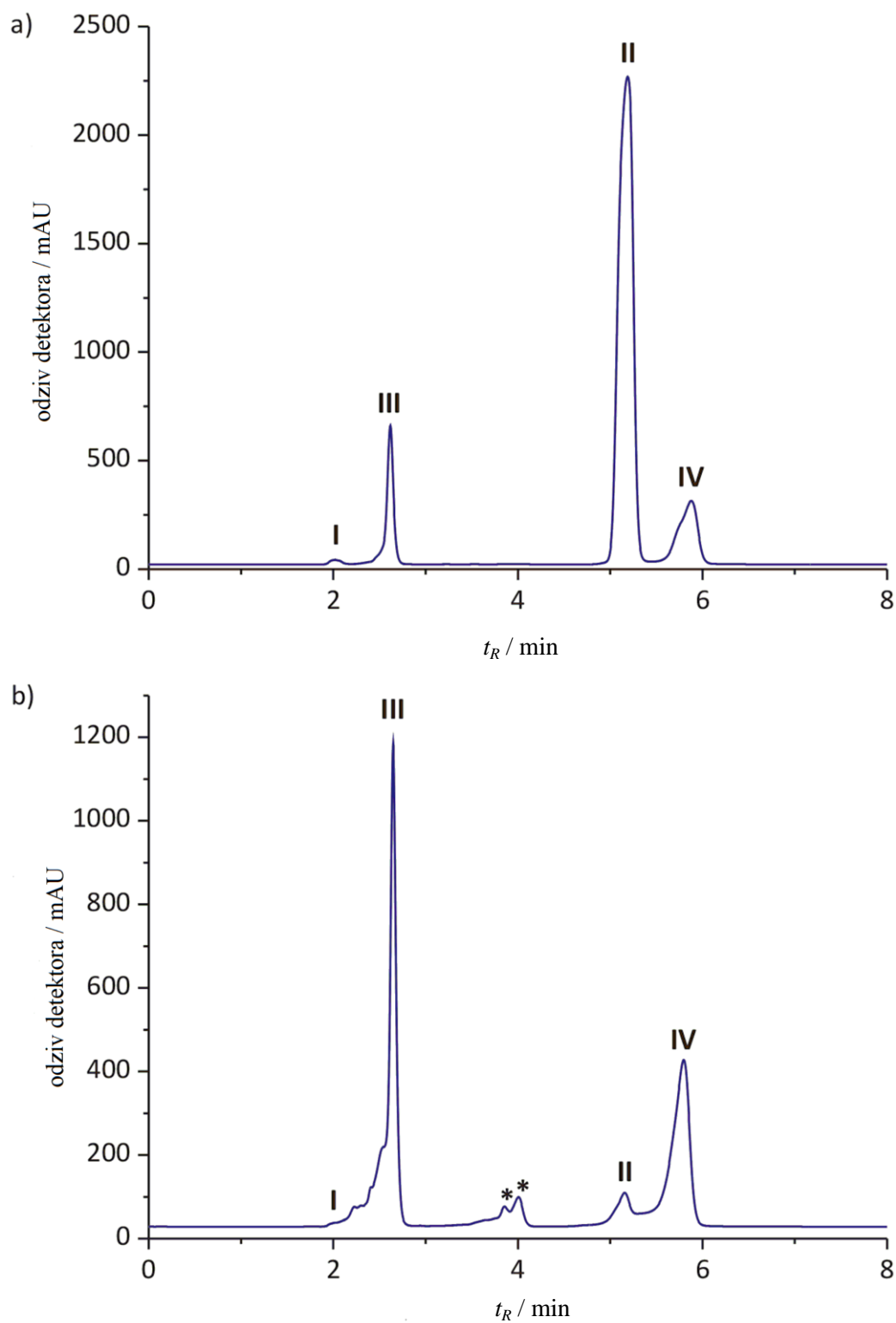
Nakon kromatografskog odjeljivanja i detektiranja pikova, odijeljene komponente su ukoncentrirane pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi kako bi se povećao omjer signala i šuma u spektrima NMR. Izvodilo se jednostruko i višestruko ekstrahiranje uzoraka na nepolarnu čvrstu fazu (C-18 i C-8). Kako bi se pojedina komponenta što bolje ekstrahirala na čvrstu fazu, brzina protoka povećana je na 3,0 mL/min. Zatim je čvrsta faza sušena tekućim dušikom 59 min, a pojedine komponente su eluirane s 336 μL deuteriranog acetonitrila u cijevčice NMR promjera 3 mm.

Spektri NMR snimljeni su na spektrometru frekvencije 400 MHz uz Prodigy krio-sondu. Za snimanje spektara ^1H NMR bilo je potrebno jednostruko ekstrahiranje produkata na SPE nosač, dok je za snimanje dvodimenzijskih (COSY, HSQC i HMBC) spektara, bilo potrebno višestruko ekstrahiranje produkata na čvrsti nosač. Spektri ^1H NMR snimljeni su uz NOESY-tip sekvencu za supresiju signala otapala.

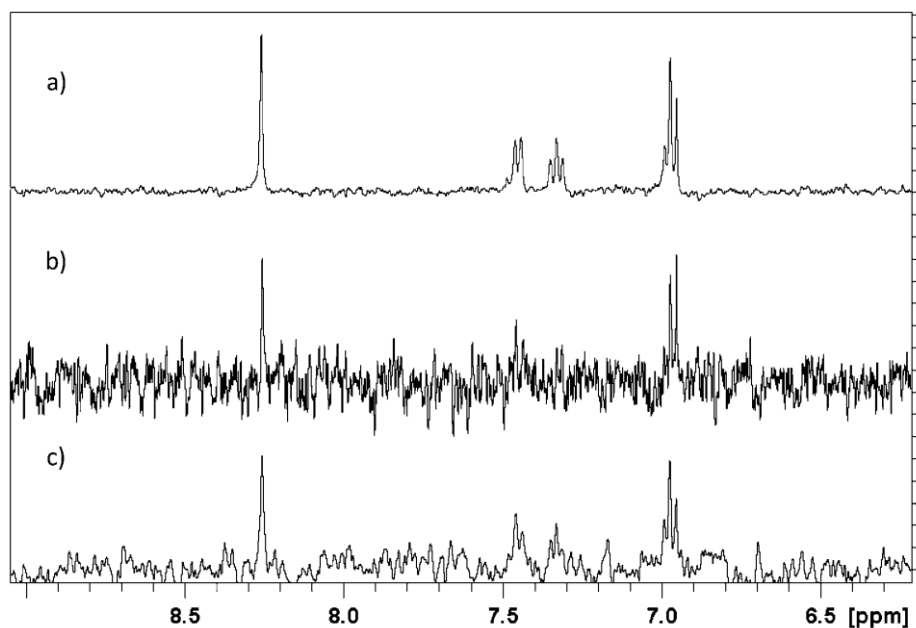
3.3. Rezultati

Identifikacija i karakterizacija reaktanata i produkata izvedena je na 2 načina. Prvo su izolirani i pročišćeni pojedini reaktanti i produkti. 25 μL smjese reaktanata i produkata podvrgnuto je kromatografskom odjeljivanju i ekstrakciji na čvrstoj fazi. Kao rezultat dobiven je kromatogram prikazan na **slici 5a**. Na kraju su identificirane pojedine reakcijske komponente. Nakon toga su direktno iz reakcijske mješe uzeti alikvoti od 20 μL na početku reakcije i nakon 3, 5, 10 i 40 min. Alikvoti su zatim otopljeni u 480 μL acetonitrila i podvrgnuti kromatografskoj analizi. Na **slici 5b** prikazan je dobiveni kromatogram alikvota uzetog 5 min nakon početka reakcije. Iz dobivenih kromatograma može se zapaziti kako vremena zadržavanja dva nastala produkta iznose 2,6 min, odnosno, 5,9 min. Iz kromatograma može se uočiti i napredak reakcije budući da pikovi reaktanata postaju sve manji kako se reakcija bliži kraju, a pikovi produkata sve veći. Na **slici 4b** moguće je uočiti dva dodatna pika za koje nije poznato kojim spojevima pripadaju jer se nisu mogli ekstrahirati na nosač SPE.

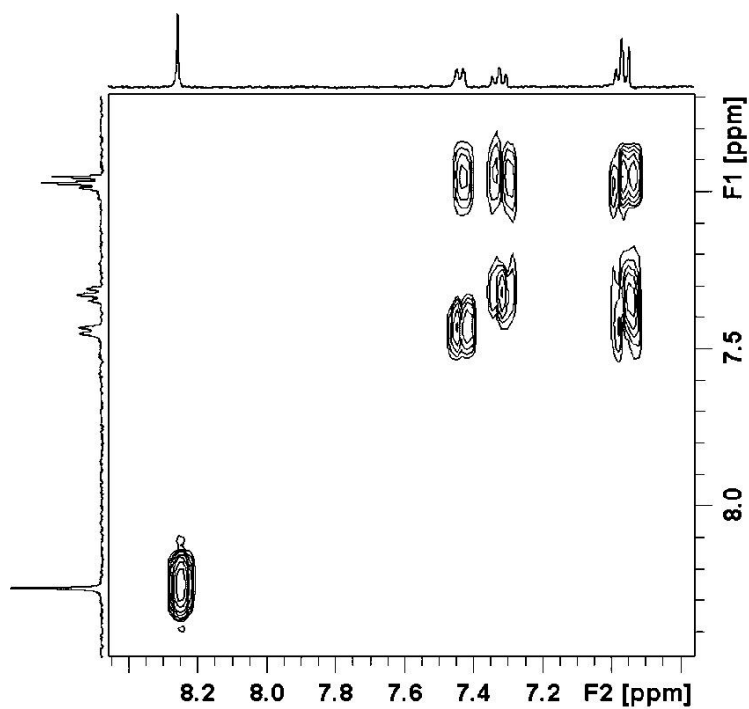
Na **slici 6** prikazan je spektar ^1H NMR produkta **IV** uz početnu masu od 1,95 μg , a na **slici 7** prikazan je spektar COSY produkta **IV** uz početnu masu od 24 μg . Dobiveni spektri su uspoređeni s već snimljenim spektrima iz baze podataka i na taj način je potvrđena struktura produkata.¹⁴



SLIKA 5. Kromatogram: a) standardne reakcijske smjese, b) alikvota reakcijske smjese uzetog 5 minuta nakon početka reakcije.¹⁴



SLIKA 6. Uvećani dio spektra ^1H NMR produkta **IV** : a) standardne reakcijske smjese, b) alikvota reakcijske smjese uzetog nakon 5 min (broj snimaka 64; trajanje 6 min) i c) alikvota reakcijske smjese uzetog nakon 5 min (broj snimaka 128; trajanje 12 min).¹⁴



SLIKA 7. Uvećani dio spektra COSY produkta **IV** izoliranog iz reakcijske smjese (broj snimaka 16; trajanje 1h i 16 min).¹⁴

§ 4. IDENTIFIKACIJA METABOLITA PARACETAMOLA IZ LJUDSKOG URINA

M. Spraul i suradnici su 2005.godine pomoću spregnutog sustava LC-SPE-NMR-MS izolirali i identificirali nepoznati metabolit paracetamola niske koncentracije iz ljudskog urina.

4.1. Eksperimentalna izvedba sustava LC-SPE-NMR-MS

Uzorak urina uzet je od zdrave muške osobe 4 sata nakon konzumacije 1 g paracetamola, skladišten pri temperaturi od -38°C do analize i unesen u kromatografsku kolonu bez prethodne pripreme. U kromatografskom odjeljivanju korišten je sustav HPLC uz brzinu protoka od 0,2 mL/min pri temperaturi 10°C kako bi se poboljšalo odjeljivanje nepoznatog metabolita. Kao mobilna faza korištena su 2 otapala, smjesa vode i mravlje kiseline te acetonitril. Pikovi su detektirani UV-Vis detektorom pri valnoj duljini od 254 nm.

Nakon kromatografskog odjeljivanja i detekcije pikova, protok analita je podijeljen i 5% volumena usmjereno je u spektrometar MS s kvadrupolnom stupicom za ione kao analizatorom mase i uz ionizaciju elektroraspršenjem, a 95% analita usmjereno je na nosač SPE. Za ekstrakciju SPE korištena su nedeuterirana otapala kako bi se izbjegla izmjena protona iz -OH, -NH, -NH₂ skupina i deuterija iz D₂O. Nakon ekstrahiranja uzorka, nosač je osušen tekućim dušikom radi uklanjanja viška otapala, a potom je analit otopljen u deuteriranom acetonitrilu.

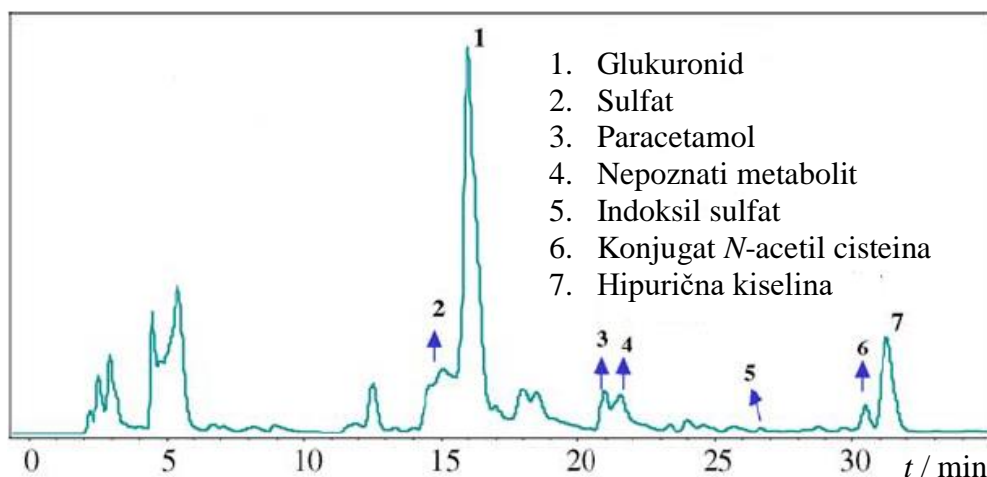
Analit otopljen u 50 μL deuteriranog acetonitrila eluiran je u cijevčice NMR promjera 3 mm i zatim su snimljeni spektri ^1H NMR na spektrometru frekvencije 500 MHz. Koristile su se tehnike supresije signala vode i acetonitrila.

Nakon analize SPE-NMR pikovi su usmjereni na analizu u spektrometar MS visokog razlučivanja s analizatorom masa ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju, kako bi se odredila točna masa nepoznatog analita.

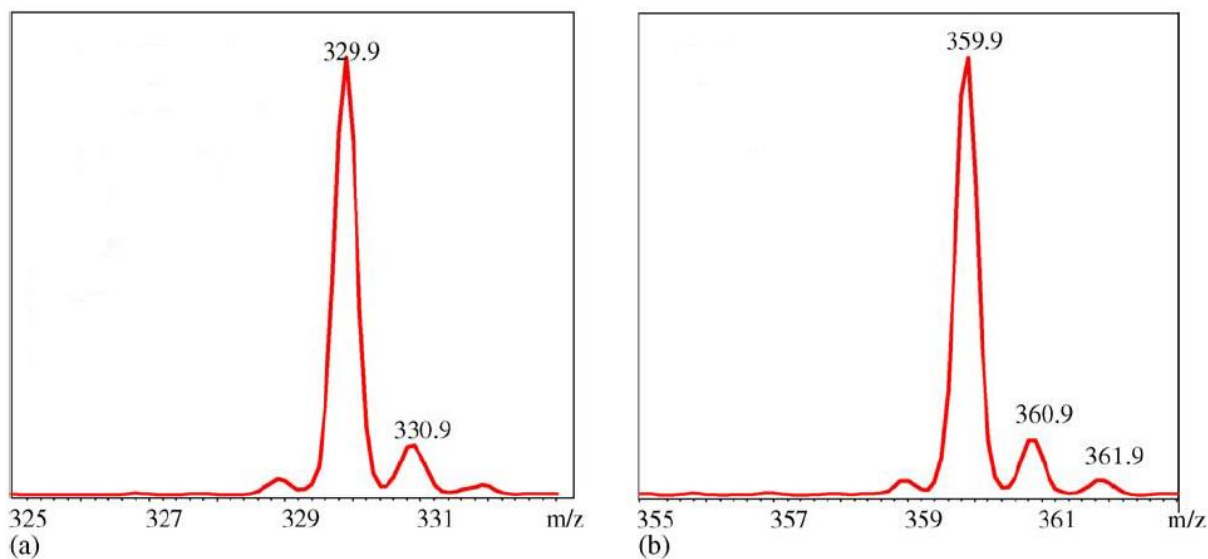
Potom je nepoznati metabolit ponovno podvrgnut kromatografskom odjeljivanju i trostrukoj ekstrakciji na nosač SPE uz sušenje pomoću tekućeg dušika i otapanju u 150 μL deuteriranog acetonitrila kako bi se mogao snimiti spektar NOESY. Uzorak je eluiran u cijevčicu NMR promjera 3mm, a spektar NOESY je snimljen na spektrometru frekvencije 600 MHz.

4.2. Rezultati

Kromatografskim odjeljivanjem metabolita paracetamola u ljudskom urinu metodom HPLC dobiven je kromatogram prikazan na **slici 8**. Na temelju kromatograma može se uočiti da nakon 4 sata od konzumacije 1 g paracetamola ukupna količina paracetamola nije do kraja metabolizirana. Na temelju analize spektrometrom MS tijekom optimizacije kromatografskog odjeljivanja dobivena je molarna masa nepoznatog metabolita, odnosno, omjer $m/z=358$ čija se molarna masa razlikuje za 30 od molarne mase glukoronida što je prikazano na **slici 9**. Budući da je u analizi korištena deuterirana voda, u obzir je uzeta i izmjena protona s deuterijem zbog čega se nije mogla odrediti točna molarna masa nepoznatog analita u ovom trenutku. Ustanovljen je i broj izmijenjenih protona koji iznosi 5.

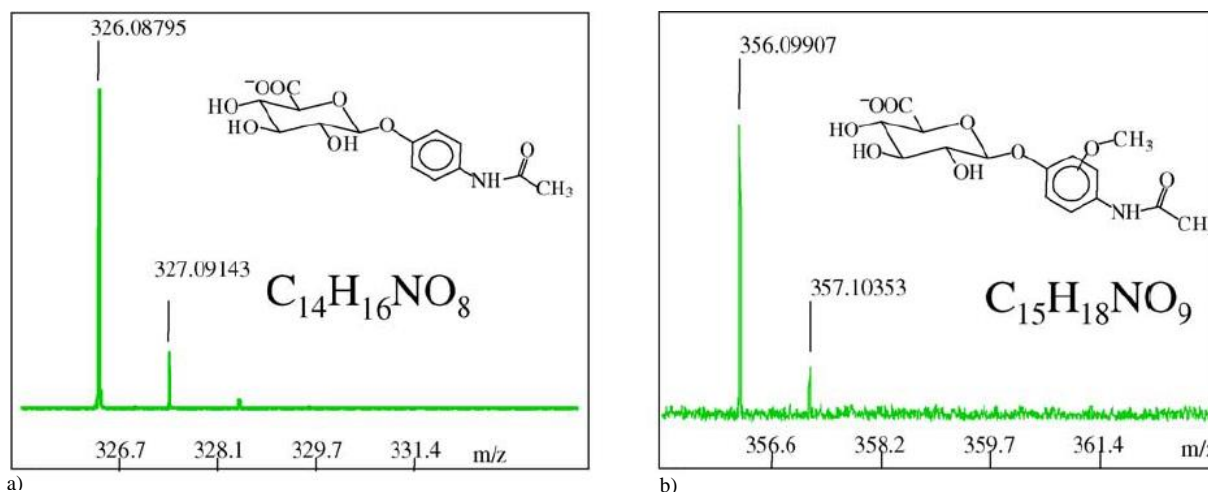


SLIKA 8. Kromatogram metabolita paracetamola u ljudskom urinu, snimljen pri valnoj duljini od 254 nm.¹⁵



SLIKA 9. Spektar MS dobiven za vrijeme optimizacije kromatografije: a) glukuronida (metabolit paracetamola) u D₂O, b) nepoznatog metabolita paracetamola u D₂O.¹⁵

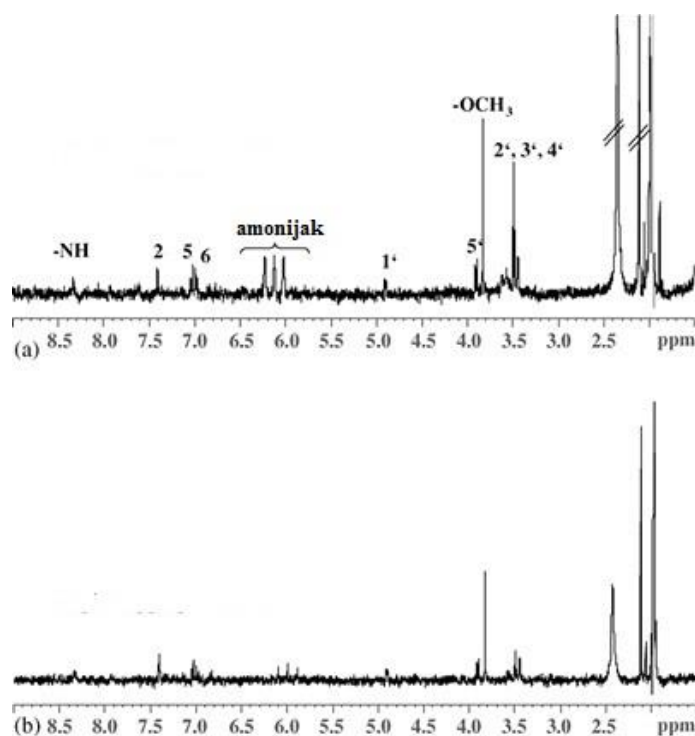
Budući da se u spektrometru MS s analizatorom mase ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju nisu koristila deuterirana otapala, određena je točna molarna masa nepoznatog metabolita iz omjera mase i naboja koji iznosi 356,0991 i predložena je molekulska formula C₁₅N₁₉NO₉. Navedeni spoj je glukuronidni eter 3-metoksi-paracetamola. Dobiveni spektri MS prikazani su na **slici 10**.



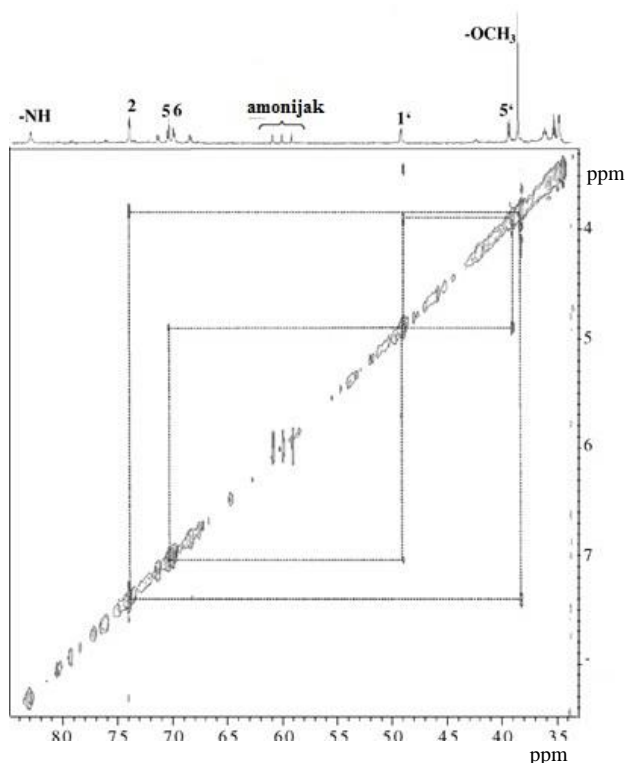
SLIKA 10. Spektar MS dobiven pomoću spektrometra s ionskom stupicom uz Fourierovu transformaciju: a) glukoronida, b) nepoznatog metabolita paracetamola.¹⁵

Spektri 1H NMR nepoznatog metabolita snimljeni nakon jednostrukog i trostrukog ekstrahiranja na nosač SPE prikazani su na **slici 11**. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se višestrukim ekstrahiranjem uzorka znatno smanjuje broj snimaka potrebnog za dobivanje kvalitetnog spektra NMR.

Na **slici 12** prikazan je spektar NOESY analiziranog uzorka.

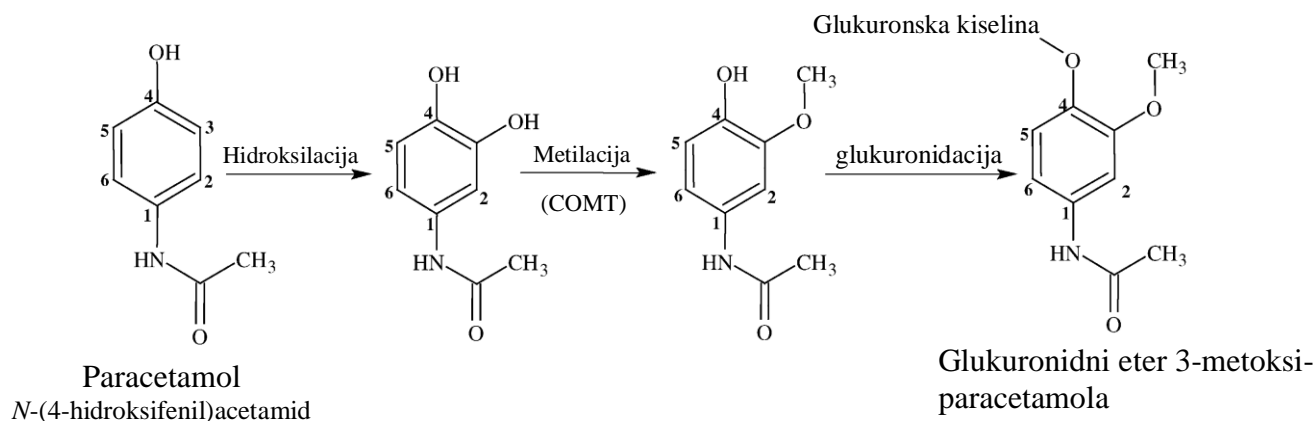


Slika 11. Spektri 1H NMR nepoznatog metabolita paracetamola nakon: a) jednostrukog ekstrahiranja uzorka na nosač SPE (broj snimaka 1024), b) trostrukog ekstrahiranja uzorka na nosač SPE (broj snimaka 128).

Slika 12. Spektar NOESY nepoznatog metabolita.¹⁵

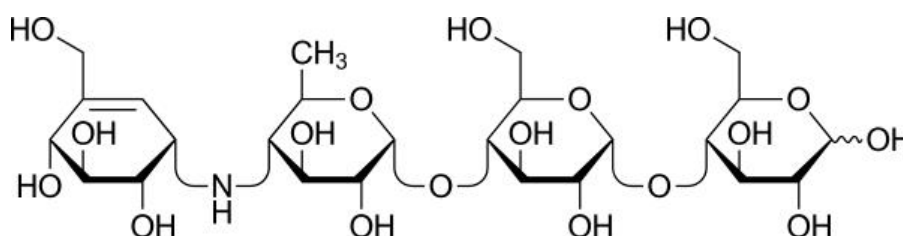
4.3. Mehanizam nastajanja glukurodnidnog etera 3-metoksi-paracetamola

Na **slici 13** prikazan je predloženi mehanizam nastajanja identificiranog metabolita. Paracetamol se prvo hidroksilira na položaju 3 aromatskog prstena, a zatim enzim *O*-metil-transferaza (COMT) katalizira prijenos metilne skupine sa *S*-adenozil-metionina na skupinu -OH na položaju 3 aromatskog prstena. Hidroksilna skupina na položaju 4 aromatskog prstena zatim podliježe konjugaciji pri čemu kao produkt nastaje glukuronidni eter 3-metoksi-paracetamola.¹⁵

Slika 13. Predloženi mehanizam nastajanja glukurodnidnog etera 3-metoksi-paracetamola.¹⁵

§ 5. IDENTIFIKACIJA ONEČIŠĆENJA AKARBOZE POMOĆU SPREGNUTIH SUSTAVA LC-NMR I LC-MS

Akarboza je ugljikohidrat koji se koristi u liječenju dijabetesa tipa 2, a fermentacijom ga proizvode bakterije *Actinomycetales*. Na **slici 14** prikazana je struktura akarboze. Akarboza inhibira enzim α -glikozidazu koji hidrolitički cijepa $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnu vezu ugljikohidrata koji se zatim razgrađuju do glukoze. Kako bi se postigla što veća čistoća lijeka, potrebno je identificirati 3 glavna onečišćenja akarboze: A, B i C. Pretpostavlja se da udjeli onečišćenja A i B iznose 0,6% i 0,7%, dok onečišćenje C nije prisutno u konačnom produktu.¹⁶



Slika 14. Struktura akarboze.

5.1. Priprema uzoraka

Za identifikaciju onečišćenja A i B spregnutim sustavom LC-NMR pripremljene su vodene otopine akarboze masene koncentracije 10 mg/mL.

Kako bi se identificiralo onečišćenje C koje je prisutno u maloj koncentraciji pripremljena je otopina akarboze volumena $V=3000$ mL otapanjem 300 g akarboze u destiliranoj vodi. Otopina je propuštena kroz kromatografsku kolonu ispunjenom kationskim izmjenjivačem uz brzinu protoka od 5,5 mL/min. Zatim je propušteno 1000 mL destilirane vode. Dobivena frakcija od sveukupno 4000 mL potom je analizirana na koloni HPLC, a nakon propuštanja vodene otopine akarboze kroz kolonu propušteno je 7000 mL vodene otopine klorovodične kiseline koncentracije $\gamma=0,5$ g/L. Analizirane su frakcije volumena 500 mL koje sadrže onečišćenje C.

5.2. Eksperimentalna izvedba

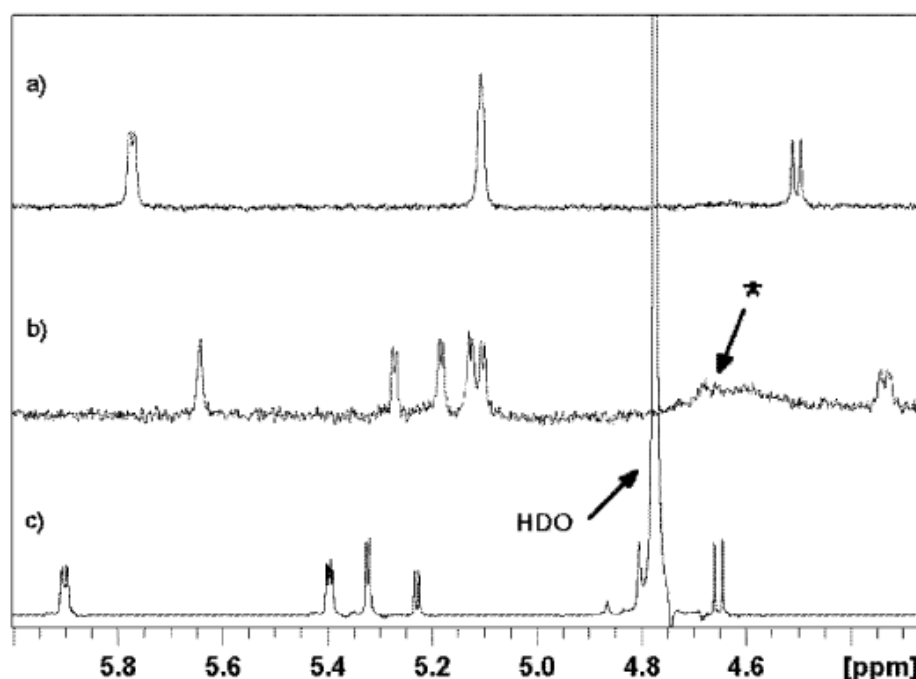
U kromatografsku kolonu uneseno je 10 μ L uzoraka uz brzinu protoka 1,5 mL/min, a kao mobilna faza korištena je smjesa od 71% acetonitrila i 29% vode čiji je pH održavan pri 6,6 pomoću fosfatnog pufera. Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 350 mg natrijeva hidrogenfosfata i 600 mg kalijeva dihidrogenfosfata u 1000 mL destilirane vode. Kromatografsko odjeljivanje trajalo je 30 min. Nakon kromatografske kolone postavljen je DAD-detektor koji je mjerio apsorbanciju pri valnoj duljini od 210 nm.

Za snimanje spektara MS spregnutim sustavom LC-MS i LC-MS/MS korišten je spektrometar MS s analizatorom mase vremena leta i uz ionizaciju elektroraspršenjem.

Spektri NMR snimljeni su tehnikom zaustavljenog protoka. Nakon kromatografskog odjeljivanja, 25 μL uzorka eluirano je u cijevčice NMR promjera 5 mm, a kao mobilna faza korištena je smjesa od 71% acetonitrila i 29% deuterirane vode uz brzinu protoka od 1,5 mL/min. Snimljeni su ^1H NMR i dvodimenzijski spektri (COSY, TOCSY, HMQC i HMBC) uz NOESY dvostruko prezasićenje za supresiju signala acetonitrila i vode.

5.3. Rezultati i identifikacija onečišćenja

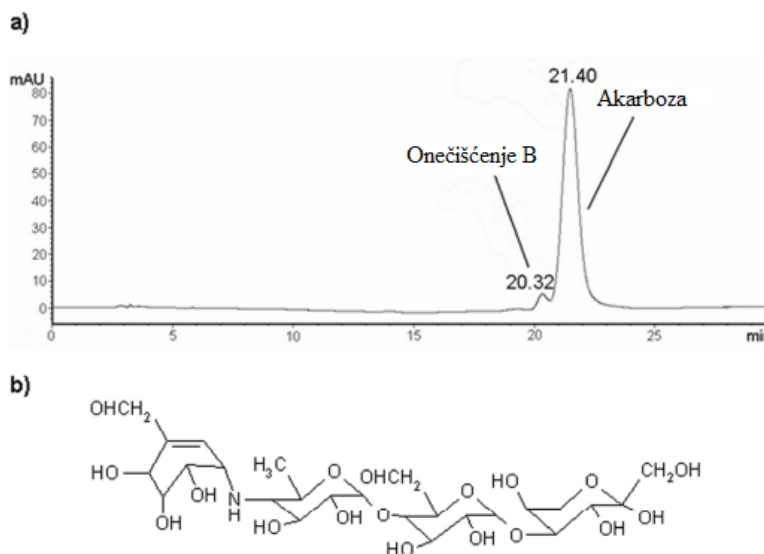
Onečišćenje A identificirano je na temelju prethodno snimljenih kromatograma i dobivenih spektara ^1H NMR kao amilostatin, što je dodatno potvrđeno spektrima MS i ES-MS/MS. Dobiveni spektri ^1H NMR prikazani su na **slici 15**.



Slika 15. Spektri NMR snimljeni na spektrometru NMR frekvencije 500 MHz tehnikom zaustavljenog protoka : a) onečišćenja A, b) onečišćenja C, c) akarboze u deuteriranoj vodi.

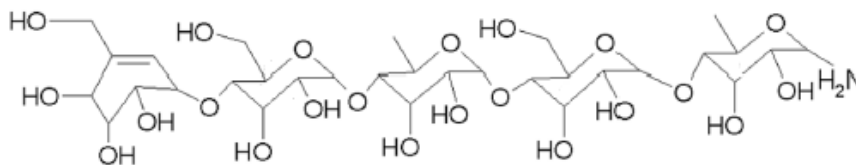
* označeni pik odgovara onečišćenju iz kromatografske kolone.¹⁶

Onečišćenje B identificirano je na temelju kromatograma akarboze i onečišćenja B te spektara MS. Iz kromatograma koji je prikazan na **slici 16a** može se zaključiti da su akarboza i onečišćenje B strukturno vrlo slični. Zbog strukturne sličnosti onečišćenja B i akarboze potrebno je optimirati kromatografsko odjeljivanje kako ne bi došlo do njihovog zajedničkog eluiranja. Iz spektara MS dobiven je omjer mase i naboja koji je isti i za onečišćenje B i za akarbozu. Struktura onečišćenja B prikazana je na **slici 16b**. Može se uočiti kako se akarboza i onečišćenje B razlikuju u položaju $-\text{CH}_2\text{OH}$ skupine na prvom D-glukopiranoznom prstenu i glikozidnoj vezi koja je kod onečišćenja B formirana na položaju 3. Zbog slabog kromatografskog odjeljivanja, dobiveni spektri NMR sadrže pikove oba spoja. Unatoč tome, onečišćenje B je uspješno identificirano.



Slika 16. a) Kromatogram akarboze i onečišćenja B, b) struktura onečišćenja B.¹⁶

Kako bi se identificiralo onečišćenje C, nakon kromatografskog odjeljivanja snimljen je spektar ^1H NMR tog onečišćenja (**slika 15b**) i uspoređen sa spektrima akarboze i onečišćenja A prikazanima na **slici 15**. Na temelju dobivenih podataka može se zaključiti kako je onečišćenje C strukturno slično akarbozi. Iz spektara MS dobiven je omjer naboja i mase koji iznosi 792,6. Njegovom usporedbom s molarnom masom akarboze koja iznosi 646,6, zaključeno je da je onečišćenje C pentasaharid i predložena je molekulska formula $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{NO}_{22}$. Potpuna struktura onečišćenja C određena je analizom spektara NMR. Na temelju spektra ^1H NMR prikazanog na **slici 15b** potvrđeno je da je onečišćenje C pentasaharid zbog prisutnosti dodatnog signala u dijelu spektra koji prikazuje anomerni ugljikov atom koji nije prisutan u spektrima akarboze i onečišćenja A, te da su prisutne dvije deoksiglukopiranozne jedinice. Dodatne strukturne informacije određene su na temelju spektara LC-TOCSY, COSY, HMQC, HMBC. Na **slici 17** prikazana je struktura onečišćenja C.

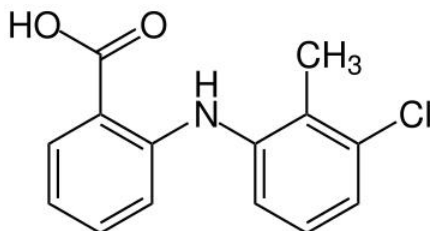


Slika 17. Struktura onečišćenja C.¹⁶

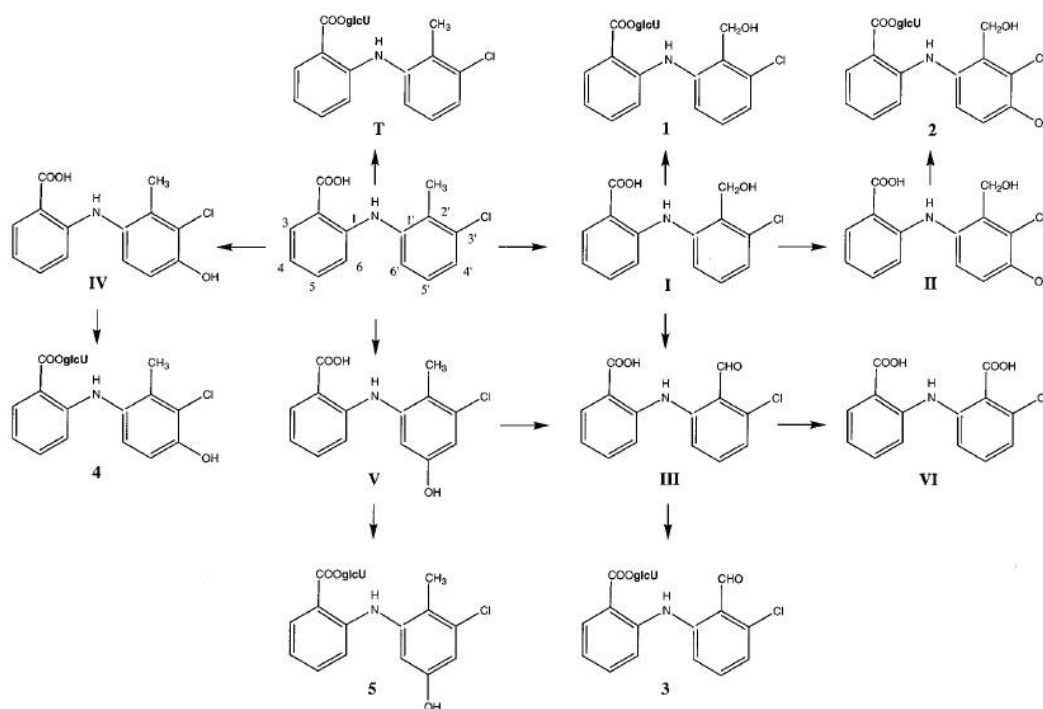
§ 6. IDENTIFIKACIJA METABOLITA 2-TOLFENAMIČNE KISELINE SPREGNUTIM SUSTAVIMA SPE-NMR I LC-NMR

Tolfenamična kiselina je nesteroidni protuupalni lijek koji pripada u skupinu derivata antranilične kiseline. Koristi se za liječenje migrena, a inhibira enzim ciklooksigenazu koji katalizira izlučivanje prostaglandina. Posljedica inhibicije ciklooksigenaze je ublažavanje simptoma upale i bolova. Na **slici 18** prikazana je struktura tolfenamične kiseline.

Metabolički put tolfenamične kiseline i metaboliti prikazani su na **slici 19**, a spregnutim sustavom LC-SPE-NMR identificirani su metaboliti tolfenamične kiseline 1-5 iz ljudskog urina. Smatra se da navedeni metaboliti stvaraju derivate glukuronske kiseline metabolizmom tolfenamične kiseline.¹⁷



Slika 18. Struktura tolfenamične kiseline.



Slika 19. Metabolički put tolfenamične kiseline.¹⁷

6.1. Priprema uzoraka

Uzorak urina uzet je od odrasle osobe 4-6 sati nakon konzumacije 300 mg tolfenamične kiseline. Kolona SPE napunjena je s 500 mg silikagela derivatiziranih nepolarnim alifatskim C-18 skupinama i aktivirana propuštanjem 5 mL metanola, pa 5 mL destilirane vode zakiseljene s 5 μ L mravlje kiseline. Uzorku urina dodano je 10 μ L koncentrirane mravlje kiseline koji je, zatim, propuštao kroz kolonu SPE. Provedeno je gradijentno eluiranje, a kao eluens korištene su smjese metanola i vode niskog pH u omjerima 20:80, 40:60, 60:40 i 100:0. Eluens je iz skupljenih frakcija uklonjen uparavanjem, a suvišak vode sušenjem tekućim dušikom. Uzorak je na kraju otopljen u deuteriranom metanolu (CD_3OD).

6.2. Eksperimentalna izvedba

Snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR sakupljenih frakcija propuštanih kroz kolonu SPE na spektrometru frekvencije 400 MHz kako bi se poboljšali signali aromatskih dijelova metabolita.

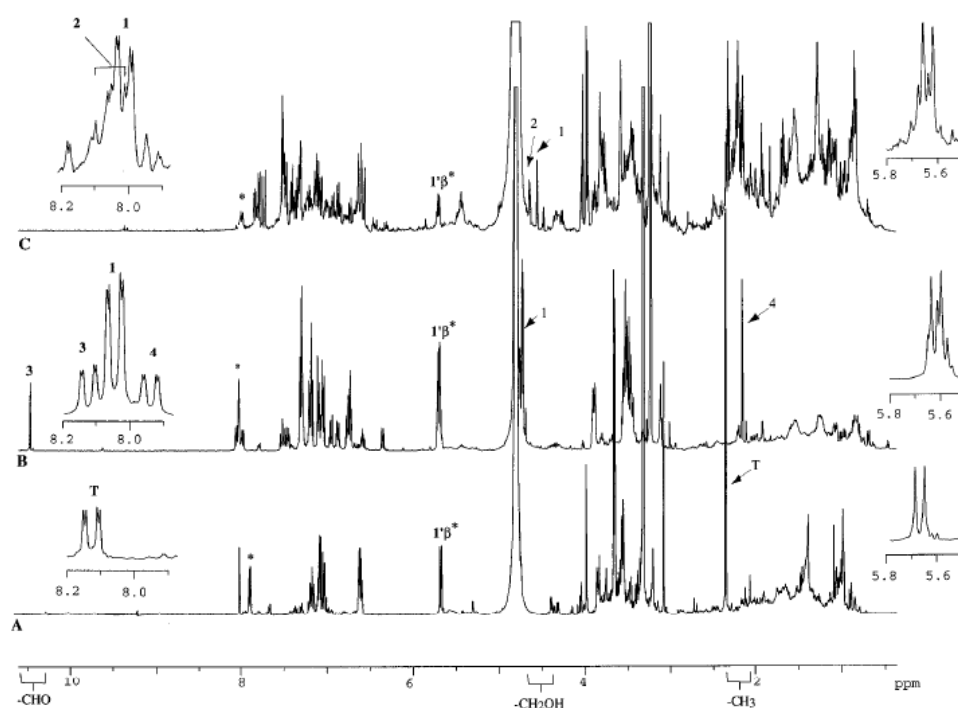
Nakon snimanja spektara NMR pojedinih frakcija dobivenih propuštanjem uzorka urina kroz kolonu SPE, metaboliti tolfenamične kiseline kromatografski su odijeljeni tehnikom obrnutih faza. Kao mobilna faza korištena je smjesa metanola, acetonitrila i fosforne kiseline koncentracije 15 mol/dm³ u omjeru 28:33:39 uz brzinu protoka od 1 ml/min. Nakon kromatografske kolone postavljen je UV-Vis detektor koji je mjerio apsorbanciju pri valnoj duljini od 280 nm.

Nakon kromatografskog odjeljivanja snimljeni su spektri NMR na spektrometru frekvencije 800 MHz. Spektri ¹H NMR snimljeni su metodom zaustavljenog protoka uz pulsni slijed NOE-SYPRESANT za supresiju signala otapala. Slijed NOE-SYPRESANT je jednodimenzionalna inačica tehnike NOESY za supresiju signala, a korišteno je trostruko prezasićenje za supresiju signala vode, metanola i acetonitrila.

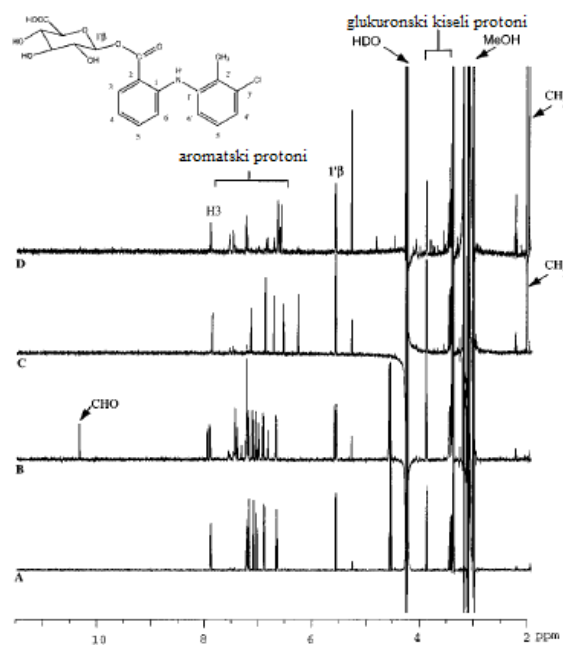
6.3. Rezultati i identifikacija metabolita

Na **slici 20** prikazani su spektri ¹H NMR dobiveni nakon propuštanja uzorka urina kroz kolonu SPE uz mobilnu fazu s udjelima metanola 100%, 60% i 40%. Uz tolfenamičnu kiselinu bili su prisutni i metaboliti koji su konjugirani s glukuronskom kiselinom. Frakcija u kojoj je kao mobilna faza bio prisutan samo metanol (**slika 20a**) sadrži samo jedan metabolit, **T** (struktura je prikazana na **slici 19**) koji je identificiran kao glukuronidni ester tolfenamične kiseline. U frakciji s udjelom metanola 60% bila su prisutna 3 metabolita konjugirana s glukuronskom kiselinom. Metabolit **3** identificiran je na temelju singleta pri 10,47 ppm što odgovara aldehidnoj skupini na položaju 2' tolfenamične kiseline. Preostala 2 metabolita identificirana su kao fenolni (**4**) i hidroksilirani metabolit (**1**). Kako bi se potvrdila struktura ta 3 metabolita, bila je potrebna daljna separacija i analiza frakcije pomoću spregnutog sustava LC-NMR. U frakciji s udjelom metanola 40% bili su prisutni hidroksilirani (**1**) i hidroksilirani fenolni metabolit (**4**).

Analizom frakcije sa 60%-tnim udjelom metanola u mobilnoj fazi pomoću spregnutog sustava LC-NMR dobiven je kromatogram na temelju kojeg je potvrđena prisutnost metabolita 1, 2, 4 i 5. Na temelju dobivenog spektra ¹H NMR i asignacije signala potvrđene su strukture metabolita, a spektar je prikazan na **slici 21**.¹⁷



Slika 20. Spektri ^1H NMR snimljeni na spektrometru NMR frekvencije 400 MHz frakcija dobivenih propuštanjem uzorka urina kroz kolonu SPE s udjelom metanola: a) 100%, b) 60%, c) 40%.¹⁷



Slika 21. ^1H NMR spektar frakcije u kojoj udio metanola u mobilnoj fazi iznosi 60%.¹⁷

§ 7. ZAKLJUČAK

Spregnuti sustav LC-NMR pokazao se kao vrlo učinkovita tehnika za analizu i identifikaciju komponenata složenih smjesa prisutnih u niskim koncentracijama, metabolita iz ljudskog urina, žuči i biljnih ekstrakata. S obzirom na ograničenja sustava LC-NMR u smislu slabe osjetljivosti, najčešće se spreže i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) u cjeloviti sustav LC-SPE-NMR. Na temelju navedenih podataka i primjera pokazano je kako ovaj sustav može biti koristan i za praćenje reakcija *on-line* i identifikaciju produkata i nečistoća, što je od ključne važnosti u razvoju i istraživanju farmaceutskih proizvoda. Da bi se analiza mogla provesti uspješno, potrebno je optimirati uvjete kromatografskog odjeljivanja, skladištenja uzorka na sustavu SPE i snimanja spektara NMR. Bolja osjetljivost analize LC-SPE-NMR postiže se višestrukim ekstrahiranjem i skladištenjem pikova na kolonama sustava SPE, korištenjem sonde s krio-tehnologijom i spektrometra NMR s jačim magnetskim poljem te dužim vremenom snimanja spektara. Kako bi se dobile što potpunije informacije o identitetu, strukturi i količini komponenata u složenoj smjesi, spregnuti sustav LC-SPE-NMR može se dodatno spregnuti sa spektrometrijom masa.

|

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, (2012) 148-173.,
2. O. Corcoran, M. Spraul, *LC–NMR–MS in drug discovery*, *DDT* **8**, (2003) 624-631
3. I. D. Wilson, *J. Chromatogr. A* **892**, (2000), 315-327.
4. D. A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, 9.izdanje, Brooks/Cole, Belmont, 2014, str. 912-921
5. S. R. Wilson, H. Malerod, D. Petersen, N. Simic, M. M. Bobu, F. Rise, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Sep. Sci.* **29**, (2006) 582-589.
6. I. Habinovec, *Spregnute tehnike u analizi metabolite lijekova*, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
7. V. Exarchou, T. A. Beek, J.J.M. Vervoot, I. P. Gerothanassis, *Magn. Reson. Chem.* **43**, (2005) 681-687.
8. N. Bross–Walch, T. Kühn, D. Moskau, O. Zerbe, *Chem. Biodiversity* **2**, (2005) 147-177.
9. K. Albert, *J. Chromatogr. A* **856**, (1999) 199-211.
10. G. Schlotterbeck, S. M. Ceccarelli, *Bioanalysis* **1(3)**, (2009) 549-559.
11. S. R. Wilson, H. Malerod, D. Petersen, F. Rise, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Sep. Sci.* **30**, (2007) 322-328.
12. N. T. Nyberg, H. Baumann, L. Kenne, *Magn. Reson. Chem.* **39**, (2001) 236-240
13. F. Xu, A. J. Alexander, *Magn. Reson. Chem.* **43**, (2005) 776-782.
14. I. Habinovec, T. Jednačak, P. Novak, *ADMET & DMPK* **3(4)** (2015) 352–358
15. M. Godejohann, L. Tseng, U. Braumann, J. Fuchser, M. Spraul, *J. Chromatogr. A* **1058**, (2004) 191-196.
16. P. Novak, M. Cindrić, P. Tepeš, S. Dragojević, M. Ilijaš, K. Mihaljević, *J. Sep. Sci.* **28**, (2005) 1442-1447
17. U. G. Sidelmann, U. Braumann, M. Hofmann, M. Spraul, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, S. H. Hansen, *Anal. Chem.* **69** (1997) 607-612